シリーズ教育講座「内耳形態と細胞機能の研究手法」

9. 内耳におけるイオンチャネル測定法

山内大輔, 中谷和弘

Measuring methods of ion channel in the inner ear

Daisuke Yamauchi, Kazuhiro Nakaya

*Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Tohoku University
Graduate School of Medicine*

Endolymph which fills the scala media is an unusual extracellular fluid in that its composition is reminiscent of intracellular fluid such as its high potassium concentration. This characteristic ion homeostasis is important for the production of the endocochlear DC potential which is the main driving force for sensory transduction. Imbalance of ion homeostasis in the inner ear is therefore closely-linked to the pathophysiological mechanism of hearing impairment and balance disorder. Moreover, it is very important to study the physiology of ion channels in the inner ear. Ion channel measuring methods have been established electro-physiologically and recently developed using molecular physiology and molecular genetics. The ion channel's function can be measured as the result of 'ion flux' by ion selective electrodes, a vibrating probe and the Ussing chamber. In this paper, ion transport models are introduced and useful ion measuring methods are explained.

Key words: ion selective electrodes, vibrating probe, Ussing chamber, inner ear

はじめに

イオンチャネルに関しては、様々な器官において、数多くの研究が行われてきた。特に内耳では、内リンパの特異なイオン組成を調整するイオンチャネルの局在・機能解析が、様々な研究手法によって明らかにされてきた。本項では内耳におけるイオンチャネルの役割について概説しつつ、様々な測定手法について解説する。

内リンパのイオン組成

内耳においては内リンパ腔（膜迷路）がその周囲の外リンパ腔（骨迷路）と隔てられ、その特異なイオン組成が維持されている。表1に示すよう

に、外リンパが体液組成とほぼ同様で Na^+ 145 mM, K^+ 5 mM, Ca^{2+} 1 mM であるのに対し、内リンパは Na^+ 1-9 mM, K^+ 150 mM, Ca^{2+} 0.02-0.2 mM, と K^+ が細胞内液にほぼ等しい高濃度である一方、 Na^+ と Ca^{2+} は低く保たれている¹⁾。また、蝸牛の内リンパ腔には内リンパ直流電位 (EP; endocochlear DC potential; 約 90 mV) があり、音の機械的エネルギーを神経伝達のための電気信号に変換するのに必要な駆動力として重要な役割を担っている。

内耳におけるイオンチャネルの役割

これらの特異的な内リンパのイオン組成は、内リンパを取り囲む上皮細胞群に存在する様々なイオンチャネル、ポンプ、トランスポーターによる

図1 内耳上皮組織におけるナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンのフロー。

イオンの能動的あるいは受動的輸送によって維持されている（図1）²⁾。

カリウムの流れ

カリウムイオンは蝸牛血管条と前庭暗細胞より内リンパへ流出され高濃度を保っている。これらは、 $\beta 2$ アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、プリン受容体などの様々なシグナル伝達経路によって調整される^{1,3,4)}。カリウムイオンは Na^+/K^+ -ATPase と $Na^+/K^+/2 Cl^-$ 共輸送体によって外リンパや血管条細胞外空間 intrastrial space から汲み取られる。そして頂端側に存在するカリウムチャネル KCNQ 1/KCNE 1 を通して、内リンパへと分泌される。塩素イオンはクロライドチャネル CIC-K/Barttin を介して拡散する。内リンパのカリウムイオンは有毛細胞や外らせん溝細胞から吸収される。

蝸牛前庭階・鼓室階では電流が検出される

が⁵⁾、これはカリウムイオンのコルチ器からの循環、ライスネル膜からの漏洩もしくは輸送によるものと考えられている⁶⁾。

ナトリウムイオンの吸収

内リンパ中のナトリウムイオン濃度は低く保たれており、これには2つのナトリウム吸収機構のモデルが考えられている。一つは、選択的ナトリウムチャネル ENaC によるもので、もう一つは非選択的陽イオン吸収機構でカリウムイオンの吸収にも与るものである。前者はライスネル膜と半規管上皮の内リンパ側に存在する ENaC によってナトリウムイオンが吸収される。また、ENaC の α サブユニットの発現は糖質コルチコイドによって促進される。ナトリウムイオンは基底側の Na^+/K^+ -ATPase によって外リンパへと汲み出される^{7,8)}。後者は蝸牛外らせん溝細胞と前庭移行細胞の内リンパ側にある非選択的陽イオンチャネ

図2 血管条におけるカリウムイオン輸送。

ルによる吸収機構で、カリウムイオンやカルシウムイオンの吸収も担っている。ここでもナトリウムイオンは基底側の Na^+/K^+ -ATPase によって外リンパへと汲み出される^{9~11)}。さらに蝸牛外らせん溝細胞ではプリンによって調節される非選択的陽イオンチャネルによってもナトリウムイオンが吸収されている⁷⁾。

カルシウムイオンの吸収

内リンパ中のカルシウムイオン濃度は低く保たれており、これには2つのカルシウム吸収機構のモデルが考えられている。一つは先に述べた蝸牛外らせん溝細胞と前庭移行細胞にある非選択的陽イオンチャネルによるカルシウムイオンの吸収である。もう一つはビタミンDによって発現促進される選択的カルシウムチャネル ECaC (TRPV 5/TRPV 6) によるカルシウム吸収機構である。ECaC によって取り込まれたカルシウムイオンは細胞質に存在するカルシウム結合蛋白であるカルビンデイン (D 9 k/D 28 k) によって効率的に拡散され、基底側の細胞膜カルシウム ATPase (PMCA 1) と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX 1) によって外リンパへと分泌される¹²⁾。

血管条におけるイオン機構

蝸牛内リンパにおける高カリウム濃度と内リンパ電位は血管条で産生されている。その特異な構造は、図2に示すように、辺縁細胞と、中間細胞・基底細胞・線維細胞からなる機能的合胞体とで2

重構造を形成し、その間隙が血管条細胞外空間 intrastrial space である。この血管条細胞外空間では既に内リンパ電位と同等のプラスの電位が発生しているのに対し、 K^+ 濃度は外リンパより更に低くなり、辺縁細胞を隔てて内リンパで高濃度に保たれている。この特異なイオン機構は電気生理学的なイオン測定法であるイオン選択電極法 ion selective electrodes¹³⁾ や振動プローブ法 vibrating probe⁷⁾ にて確かめられた。同様に前庭においても、暗細胞がカリウムイオンを内リンパへ分泌し高カリウム濃度を産生している事が確認された¹⁴⁾。その後の様々な研究によって、各種イオンチャネルやポンプ、トランスポーターなどが複雑なイオン輸送を担い維持していることがわかってきた(図1)。

内耳研究におけるイオン測定法

内リンパにおけるカリウムイオンなどは電気生理学的手法によって計測することができ、それによって内耳の機能評価を可能にした。例えばイオン選択電極法による内リンパのイオン濃度、pH などの測定は *in vivo* では遺伝難聴モデル動物の内耳機能の障害機序を推定するのに有用である^{15,16)}。また *in vitro* でも卵形囊の3次元培養モデルが *in vivo* に近いカリウム濃度を維持していたことが確かめられた¹⁷⁾。一方、振動プローブ法によって新鮮な内耳上皮組織のイオン輸送を捉えることができる^{7,14)}。また、ウッシングチャンバ

図3 イオン選択電極法による内リンパ電位とイオン濃度測定。AMP増幅器。

一法 Ussing chamber を用いると、血管条辺縁細胞や前庭暗細胞上皮などを用い *in vitro* のイオン輸送を捉え、イオンチャネルの機能を調べることも可能である^{18, 19)}。

イオンチャネルの局在やその機能を調べる電気生理学の実験法としては、単チャネルを測定できるパッチクランプ patch clamp 法が優れた研究方法として位置づけられている。この方法については67-4号掲載伊藤が詳しく解説しておられるのでご参照頂きたい。本項ではイオン選択電極法と振動プローブ法などの電気生理学的手法を中心に具体例などとともに解説する。

イオン選択電極法

液状イオン交換体 liquid ion exchanger を用いるとある特定のイオンを選択的に透過させる液状の膜を形成できる。この性質を用いて、2本のガラス電極の一方に塩化ナトリウムや塩化カリウム溶液を満たし、他方に液状イオン交換体を満たし、両方の電位の差を計測することで、Nernst の式 $E = RT/ZF \ln ([I]_{out}/[I]_{in})$ により計算し、イオン濃度を測定することができる。このときイオン電荷によりイオン濃度の10倍変化に対する電位差の増加が異なることに留意したい。すなわち、37℃の条件下ではナトリウムイオンやカリウムイオンなどの1価イオンはおよそ60 mV ずつ

表1 哺乳類内耳の内外リンパにおける各イオンの組成を示す。外リンパに比較して、内リンパでは主に K⁺ 濃度が著しく高く、逆に Na⁺ が低い。(2) より一部改変。

	内リンパ 蝸牛／前庭	外リンパ
K ⁺	157/149 mM	5 mM
Na ⁺	1/9 mM	145 mM
Ca ²⁺	20/200 μM	1 mM
Cl ⁻	132/119 mM	120 mM
HCO ₃ ⁻	31/?mM	20 mM

変化するのに対し、カルシウムイオンなどの2価イオンの場合には約30 mV ずつ変化することになる。また、異なる温度条件下でも測定値が変わってしまうことに注意しなければならないため、実験動物を37℃に維持するように温めるヒーターや、*in vitro* の実験では細胞の培養液などが一定の温度を維持できるような装置が必須となる。各種液状イオン交換体を表2に示す。水素イオンの液状イオン交換体を用いれば、pH を測定できることになる。

特に内耳では内リンパの流出などでイオンのホメオスタシスを損なうことがないように、できるだけ小さい穿孔をあけて測定する。そのためには、2本の電極をひとまとめにした double-barreled electrodes (図3)¹⁵⁾ を用いると良い。

Double-barreled electrodes は2本のフィラメント入りのガラス管 (WPI 1 B 100 F-4) を用い、プラー (PD-5 ナリシゲ) にて熱しながら左右に180度ずつ回してから引き伸ばし作成する。先端の形状は測定目的のイオンによって調整が必要なので、加熱時間や牽引力を微妙に調整して行う。液状イオン交換体を挿入するほうの後端を少し長めに作成しておき、200℃に熱したチャンバーに立て、この長いガラス管のみをシラン処理する。(短いガラス管には小さく切ったパラフィルムなどで栓をしておく。シランは猛毒なので必ず換気フード内で行うこと。) 短いガラス管に150 mM KCl (K⁺測定目的のときは500 mM NaCl を用いる。) を、長いガラス管に液状イオン交換体を満たし銀—塩化銀電極を挿入する。このとき適

表2 液状イオン交換体 Liquid Ion Exchanger。測定目的のイオンによって選択する。
pH 測定が目的の場合 H^+ を選択すればよい。(25) より改変。

測定イオン	液状イオン交換体				カタログ番号
H^+	水素	イオノフォア	I-カクテル	A, B	Fluka 95291/95293
H^+	水素	イオノフォア	II-カクテル	A	Fluka 95297
K^+	カリウム	イオノフォア	I-カクテル	A, B	Fulka 60031/60398
Na^+	ナトリウム	イオノフォア	I-カクテル	A	Fulka 71176
Na^+	ナトリウム	イオノフォア	II-カクテル	A	Fulka 71178
NH_4^+	アンモニウム	イオノフォア	I-カクテル	A, B	Fulka 09879
Ca^{2+}	カルシウム	イオノフォア	I-カクテル	A	Fulka 21048
Ca^{2+}	カルシウム	イオノフォア	II-カクテル	A	Fulka 21196
Mg^{2+}	マグネシウム	イオノフォア	II-カクテル	A	Fulka 63085
Cl^-	塩化物	イオノフォア	I-カクテル	A	Fulka 24902

当な溶液で後方を満たしてもよい。溶液が蒸発しないように栓をしておく。

In vivo の測定時は体温 (37°C) と同じ温度の calibration 用の溶液を準備しておく。例えば K^+ の測定には 1, 3, 10, 30, 100, 150, 300 mM K^+ 溶液を使用する。筆者らは動物を暖めるヒーターが calibration 溶液用の試験管立てと一体になった金属製のブロックを用いて、動物と溶液の温度を一定になるように工夫した。Calibration で得られたグラフから、実際の測定値を計算しグラフ化する。

振動プローブ法

振動プローブ法は1974年 Jaffe らによりはじめて使用され、100–1000 Hz で振動する金属電極を用い、位相弁別検出器 (phase sensing detector; PSD) によって高感度に電位勾配を現象として計測できる Self-referencing electrodes である¹³⁾。現在は更に改良されたイオン選択電極で、特定のイオンの流れを捉えることができる。すなわち振動プローブ法によって、上皮細胞からのイオンの流入を計測することができる。詳しい原理については University of Massachusetts Vibrating Probe Facility (http://www.bio.umass.edu/biology/kunkel/nvp_umass.html) によくまとまっているので興味のある方は是非参照いただきたい。

内耳における振動プローブ法による計測は特異なイオン組成を持つ内リンパのイオンチャネルの働きを直感的に捉える優れた手法である。Marcus

らは、カリウムイオンの排出と吸収が蝸牛と前庭において類似した構造によって維持されていることを示した。すなわち、蝸牛の血管条の辺縁細胞と前庭の暗細胞 dark cell がカリウムイオンを分泌しており、蝸牛の外側溝細胞 (OSC) と前庭の移行細胞 (VTC) が吸収していることを示した。また、OSC と VTC ではナトリウムイオンも吸収していることを証明し、non selective cation channel の存在を示唆した^{7,14)}。

ウッシングチャンバー法

ウッシングチャンバー法は、1950年に Ussing と Zerahn によってカエルの表皮における Na 輸送に応用された測定法である²⁰⁾。溶液の水槽を2部屋に区切り、間に窓を開けてそこに測定目的の上皮膜を張り、両側に塩橋 (生理的塩類溶液を2–3 %寒天で固めたもの) を介して電極を接続する。電解質の流れ、電気化学ポテンシャル、透過性といった膜輸送における電気化学的特性を、電流、起電力、電気抵抗といった電気回路の用語で表現し、膜輸送を電氣的な等価回路として表す。膜の電解質輸送を等価回路で表すと、膜両側の溶液で解離している電解質 i の能動輸送は、抵抗 R_i と起電力 E_i を直列につないだ回路を流れる電流 I_i として表され、抵抗 R_Σ は受動輸送における抵抗の総和と考えることができる。ここで、膜の両側に存在する溶液の化学組成をまったく同じにしておけば、膜を介した電気化学ポテンシャル勾配が無くなるので、両溶液間の拡散電位は0になる

はずである。したがって、もしもこのとき膜の両側の溶液間で電位差が発生していれば、電解質が何らかの能動的な駆動力によって輸送されていることになる。これを起電性電解質輸送と呼び、ウッシングチャンパー法では短絡回路のスイッチが開いていることから、このときの電位を開放回路電位と呼ぶ。この開放回路電位が経上皮電位である。ここで、スイッチを閉じ、外部の電池 E_{ext} の電圧を調節して、膜の両側溶液間の電位差が 0 になるように電圧固定したとすると、これは両溶液間を短絡したことと同じこととなるので、この状態を短絡回路状態と呼ぶ。このとき短絡回路を流れる電流を短絡電流 short-circuit current (I_{sc}) と呼び、これは、膜を介した起電的電解質輸送による電解質の流れに相当した大きさの電流である。短絡電流法では、この短絡電流 I_{sc} を測定することで、上皮膜の起電的電解質輸送の指標とする。 I_{sc} を記録しながら、薬物を投与すれば、薬物投与による起電的電解質輸送の変化を I_{sc} の変化として連続的に記録することができる²¹⁾。

内耳組織は微小であるため、マイクロウッシングチャンパー法を用いた計測が成功している。須納瀬らは、血管条辺縁細胞や前庭暗細胞上皮などのカリウムイオンの頂端側への流出をマイクロウッシングチャンパー法によって I_{sc} を測定することとらえることに成功している^{18,19)}。

ラジオアイソトープ

ラジオアイソトープを用いると、比較的長い時間の測定が可能のため、緩やかなイオン輸送であっても測定できる。上皮組織の頂端側と基底側での放射性同位元素でラベルしたイオンの濃度変化を捉える方法により、上皮組織のイオンチャネルなどがどれだけイオン輸送を行ったか計算する。例としては、ラットの半規管上皮細胞を培養し、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ でラベルした培養液を頂端側と基底側にそれぞれ浸し、ビタミン D やカルシウムチャネル阻害剤などによる変化を計測することで、半規管膜の TRPV 5/TRPV 6 チャネルを中心としたカルシウム輸送機能が示された²²⁾。

その他の測定法について

上述の電気生理学的手法の他にも Flu 2 による細胞内カルシウムイオン測定法などがあるが、こちらは 67-2 号掲載原田の項をご参照いただきたい。最近では多焦点蛍光顕微鏡などの進歩によ

り、FM-143 などの蛍光色素を用いて有毛細胞の機械受容チャネル mechanosensitive channel からの取り込みを機能的に解析する方法なども報告されている²³⁾。

また、電気生理学的手法に限らず、イオンチャネルは蛋白質であるので、免疫組織学的手法によって、その局在を調べることができ、ウェスタンブロット法や RT-PCR によって蛋白質や RNA の発現を証明する方法も一般的である。近年では分子生物学、分子遺伝学の進歩により、機能評価としての電気生理学的手法と組み合わせて総合的にイオンチャネルの研究が行われている。ある細胞株にイオンチャネルの遺伝子を導入することで、人工的な環境を作り出し、分子生物学的手法や電気生理学的手法を用いて、そのイオンチャネルの構造や機能を詳しく解析することもできる。Peng らはアフリカツメガエル卵母細胞に先に述べた TRPV 5/TRPV 6 チャネルをクローニングし、電気生理学的手法にてチャネルの特性を調べている²⁴⁾。

まとめ

イオンチャネルの研究が始まってから約半世紀が過ぎたが、様々に工夫された電気生理学の実験法によって、生体にとってそれが重要な役割を果たしていることが明らかになっていった。1980 年代以降は分子生物学の目覚ましい進歩により、構造解析が進みその機能が明らかとなっていた。そして今日では分子遺伝学の発展によって、さらに多様で複雑な実験が可能となり、今後はナノテクノロジーの進歩などによって更なる発見や応用が期待されている。内耳研究においてもこれらの実験方法をうまく組み合わせて、病態解明や治療の開発へと発展し、患者への福音となることを願う。

文 献

- 1) Wangemann P, Schacht J: Homeostatic mechanisms in the cochlea. In ed Dallos P, Popper AN, Fay RR. The Cochlea. pp 130-185, Springer-Verlag, New York, 1996
- 2) Marcus D, Pondugula S, Lee J, et al: Ion-transport pathways in the cochlea and vestibular labyrinth. 5th International Symposium Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disorders, pp 40, 2005

- 3) Wangemann P, Shen Z, Liu J: K(+)-induced stimulation of K⁺ secretion involves activation of the IsK channel in vestibular dark cells. *Hear Res* 100: 201-210, 1996
- 4) Wangemann P, Liu J, Shimozono M, et al: Beta 1-adrenergic receptors but not beta 2-adrenergic or vasopressin receptors regulate K⁺ secretion in vestibular dark cells of the inner ear. *J Membr Biol* 170: 67-77, 1999
- 5) Zidanic M, Brownell WE: Fine structure of the intracochlear potential field. I. The silent current. *Biophys J* 57: 1253-1268, 1990
- 6) Wangemann P: K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hear Res* 165: 1-9, 2002
- 7) Lee JH, Marcus DC: Endolymphatic sodium homeostasis by Reissner's membrane. *Neuroscience* 119: 3-8, 2003
- 8) Pondugula SR, Sanneman JD, Wangemann P, et al: Glucocorticoids stimulate cation absorption by semicircular canal duct epithelium via epithelial sodium channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 1127-1135, 2004
- 9) Chiba T, Marcus DC: Nonselective cation and BK channels in apical membrane of outer sulcus epithelial cells. *J Membr Biol* 174: 167-179, 2000
- 10) Marcus DC, Chiba T: K⁺ and Na⁺ absorption by outer sulcus epithelial cells. *Hear Res* 134: 48-56, 1999
- 11) Thorne PR, Munoz DJ, Housley GD: Purinergic modulation of cochlear partition resistance and its effect on the endocochlear potential in the guinea pig. *J Assoc Res Otolaryngol* 5: 58-65, 2004
- 12) Yamauchi D, Raveendran NN, Pondugula SR, et al: Vitamin D upregulates expression of ECAC 1 mRNA in semicircular canal. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1353-1357, 2005
- 13) Marcus DC: Acoustic transduction. In ed Sperelakis N. *Cell Physiology sourcebook*. 3 ed. pp 775-794, Academic press, 2008
- 14) Lee JH, Chiba T, Marcus DC: P2X2 receptor mediates stimulation of parasensory cation absorption by cochlear outer sulcus cells and vestibular transitional cells. *J Neurosci* 21: 9168-9174, 2001
- 15) Gow A, Davies C, Southwood CM, et al: Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci* 24: 7051-7062, 2004
- 16) Wangemann P, Nakaya K, Wu T, et al: Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 1345-1353, 2007
- 17) Gaboyard S, Chabbert C, Travo C, et al: Three-dimensional culture of newborn rat utricle using an extracellular matrix promotes formation of a cyst. *Neuroscience* 133: 253-265, 2005
- 18) Sunose H, Liu J, Marcus DC: cAMP increases K⁺ secretion via activation of apical IsK/KvLQT 1 channels in strial marginal cells. *Hear Res* 114: 107-116, 1997
- 19) Sunose H, Liu J, Shen Z, et al: cAMP increases apical IsK channel current and K⁺ secretion in vestibular dark cells. *J Membr Biol* 156: 25-35, 1997
- 20) Ussing HH, Zerahn K: Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23: 110-127, 1951
- 21) 唐木晋一郎, 桑原厚和: 上皮膜における電解質輸送の電気生理学的測定法: 短絡電流法. *日薬理誌* 123: 211-218, 2004
- 22) Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, et al: Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV 5 and TRPV 6 channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 1314-1321, 2007
- 23) Meyers JR, MacDonald RB, Duggan A, et al: Lighting up the senses: FM 1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *J Neurosci* 23: 4054-4065, 2003

- 24) Peng JB, Brown EM, Hediger MA: Epithelial Ca^{2+} entry channels: transcellular Ca^{2+} transport and beyond. *J Physiol* 551: 729–740, 2003
- 25) Voipio J, Pasternack M, Macleod K: Ion-sensitive microelectrodes. In ed Ogden DC. *Microelectrode techniques, The Plymouth workshop handbook*. 2nd. pp 275–316, Company of Biologists, Cambridge, 1994